





## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

用於治療阿茲海默症之組合物及方法

### 【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING  
ALZHEIMER'S DISEASE

### 【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於以下領域：醫藥劑及該等醫藥劑用於其疾病治療之用途，特定言之，靶向且抑制信號轉導與轉錄活化因子1 (STAT1)、膽固醇25-羥化酶(CH25H)及25-羥化膽固醇(25-OHC)之醫藥劑；及該等醫藥劑用於控制生理病狀、尤其藉由減少類澱粉 $\beta$ 沈積來治療及/或預防包括中樞神經系統病症、諸如阿茲海默症之神經退化性疾病及其他疾病的各種疾病之用途。

### 【先前技術】

【0002】 隨著人類之壽命延長，阿茲海默症(AD)正變為世界性的普遍健康問題。AD患者在其記憶、定向、判斷及推理方面遭受認知減退(Tanzi及Bertram 2005)。典型地，罹患疾病至導致死亡之最終階段耗時約10年。迄今為止，無可用治癒或預防療法。

【0003】 為類澱粉前驅蛋白質(在下文中稱為APP)之代謝物的A $\beta$ 蛋白質之沈積以及其在腦中之毒性視為罹患AD之主要致病因子(Selkoe 2001)。A $\beta$ 係在AD患者中所見之老年斑中鑑別的蛋白質組分(Ikeda, Wong等人 1987, Cole, Masliah等人 1991)。生物學上，A $\beta$ 係經由類澱粉- $\beta$ 前驅蛋白質(APP)之依次裂解生成，其產生不同大小之片段。醫藥研究已將

A $\beta$ 42鑑別為最能導致罹患AD之致病形式(Roher, Chaney等人 1996, Morelli, Prat等人 1999)。A $\beta$ 42產生係由APP之 $\beta$ -及隨後 $\gamma$ -裂解造成(Citron 2010, De Strooper, Vassar等人 2010)。此不可溶A $\beta$ 42片段聚集於細胞外空間中形成斑。數條證據表明，可溶A $\beta$ 42寡聚物毒性甚至更大。A $\beta$ 42之存在對突觸活性具有一定影響。A $\beta$ 42聚積有可能誘導異常網路活動及突觸抑制(Palop及Mucke 2009)。

**【0004】** 基因轉殖小鼠模型中之臨床前研究已顯示，免疫療法在預防AD及朊病毒疾病兩者方面具有極大功效(Wisniewski 2012)。知曉A $\beta$ 係AD之中心分子，已針對經由小分子或免疫療法根除A $\beta$ 開發出數種策略(Tabira 2011, Huang及Mucke 2012, Ozudogru及Lippa 2012, Delrieu, Ousset等人 2014)。儘管A $\beta$ 導引之免疫接種在小鼠AD模型中具有有前景的結果，但轉化為供人類用之有效療法仍具挑戰性。

**【0005】** 在活性疫苗接種試驗中，相對於非免疫接種對照，已接受活性免疫接種之個體的斑負荷顯著降低且A $\beta$ 引人注目地減少。無關於令人鼓舞的結果，治療組在長期存活、達至罹患重度癡呆之時間及認識功能方面未展示改良(Holmes, Boche等人 2008)。靶向A $\beta$ 之被動免疫接種之最近的兩大III期試驗亦以無臨床益處之證據而告終(Doody, Thomas等人 2014, Salloway, Sperling等人 2014)。因此，期望找到新的且新穎的用於AD之治療或預防性療法。

#### **【發明內容】**

**【0006】** 在一個態樣中，本發明係一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，其藉由向該個體投與醫藥學上有效量之STAT1抑制劑來進行。在一個實施例中，該STAT1抑制劑係針對IFN或IFN受體之抗體。在另一實

施例中，該STAT1抑制劑係針對IL-6或IL6受體之抗體。在再另一實施例中，該STAT1抑制劑係抑制JAK1及JAK3之藥劑。在又再另一實施例中，該STAT1抑制劑係減少STAT1磷酸化之藥劑。在另一實施例中，該STAT1抑制劑係阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。在另一實施例中，該STAT1抑制劑係針對STAT1之RNAi藥劑。

【0007】 在另一態樣中，本發明係一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，其藉由向該個體投與醫藥學上有效量之CH25H抑制劑來進行。在一些實施例中，該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑。在另一實施例中，該CH25H抑制劑係為針對IFN或IFN受體之抗體的STAT1抑制劑。在又另一實施例中，該CH25H抑制劑係為針對IL-6或IL6受體之抗體的STAT1抑制劑。在再另一實施例中，該CH25H抑制劑係為抑制JAK1及JAK3之藥劑的STAT1抑制劑。在另一實施例中，該CH25H抑制劑係為減少STAT1磷酸化之藥劑的STAT1抑制劑。在另一實施例中，該CH25H抑制劑係為阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑的STAT1抑制劑。在再另一實施例中，該CH25H抑制劑係為針對STAT1之RNAi藥劑的STAT1抑制劑。

【0008】 在另一態樣中，本發明係一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，其藉由向該個體投與醫藥學上有效量之25-OHC抑制劑來進行。在一個實施例中，該25-OHC抑制劑係CH25H抑制劑或STAT1抑制劑。在另一實施例中，該25-OHC抑制劑係25-OHC之類似物。在又另一實施例中，該25-OHC抑制劑係3-羥基-3-甲基-戊二醯基-輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑，例如辛伐他汀。

【0009】 在另一態樣中，本發明係一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，其藉由向該個體投與醫藥學上有效量之STAT1抑制

劑來進行。在一個實施例中，該STAT1抑制劑係針對IFN或IFN受體之抗體。在另一實施例中，該STAT1抑制劑係針對IL-6或IL-6受體之抗體。在又另一實施例中，該STAT1抑制劑係抑制JAK1及JAK3之藥劑。在再另一實施例中，該STAT1抑制劑係減少STAT1磷酸化之藥劑。在另一實施例中，該STAT1抑制劑係阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。在再另一實施例中，該STAT1抑制劑係針對STAT1之RNAi藥劑。

**【0010】** 在又另一態樣中，本發明係一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，其藉由向該個體投與醫藥學上有效量之CH25H抑制劑來進行。在一些實施例中，該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑。在一個實施例中，該STAT1抑制劑係針對IFN或IFN受體之抗體。在另一實施例中，該STAT1抑制劑係針對IL-6或IL-6受體之抗體。在又另一實施例中，該STAT1抑制劑係抑制JAK1及JAK3之藥劑。在再另一實施例中，該STAT1抑制劑係減少STAT1磷酸化之藥劑。在另一實施例中，該STAT1抑制劑係阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。在再另一實施例中，該STAT1抑制劑係針對STAT1之RNAi藥劑。

**【0011】** 在再另一態樣中，本發明係一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，其藉由向該個體投與醫藥學上有效量之25-OHC抑制劑來進行。在一些實施例中，該25-OHC抑制劑係CH25H抑制劑或STAT1抑制劑。在其他實施例中，該25-OHC抑制劑係25-OHC之類似物。在再其他實施例中，該25-OHC抑制劑係3-羥基-3-甲基-戊二醯基-輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑，例如辛伐他汀。

**【0012】** 在再另一實施例中，本發明係一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，其藉由以下方式進行：提供基因組編輯工具；將該基因組

編輯工具遞送至神經細胞；及藉由刪除整個STAT1基因、該STAT1基因之磷酸化位點、該STAT1基因之啟動子區域或該STAT1基因之SH2結構域來編輯該STAT1基因。在一些實施例中，該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

**【0013】** 在再另一態樣中，本發明係一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，其藉由以下方式進行：提供基因組編輯工具；將該基因組編輯工具遞送至神經細胞；及藉由刪除整個CH25H基因、該CH25H基因之組胺酸簇區域或該CH25H基因之啟動子區域來編輯該CH25H基因。在一些實施例中，該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

**【0014】** 在另一態樣中，本發明係一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，其藉由以下方式進行：提供基因組編輯工具；將該基因組編輯工具遞送至神經細胞；及藉由刪除整個STAT1基因、該STAT1基因之磷酸化位點、該STAT1基因之啟動子區域或該STAT1基因之SH2結構域來編輯該STAT1基因。在一些實施例中，該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

**【0015】** 在再另一態樣中，本發明係一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，其藉由以下方式進行：提供基因組編輯工具；將該基因組編輯工具遞送至神經細胞；及藉由刪除整個CH25H基因、該CH25H基因之組胺酸簇區域或該CH25H基因之啟動子區域來編輯該CH25H基因。在一些實施例中，該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0016】** 專利或申請案檔案含有至少一個彩製圖式。在申請且支付

必要費用後，專利局將提供具有彩色圖式之本專利或專利申請公開案之複本。

**【0017】 圖1A及1B**係展示在患有阿茲海默症之患者中偵測到升高之磷酸化STAT1水準的影像。**圖1A**展示四個影像，展示來自三名AD患者(病例-1、病例-2及病例-3)及健康之人(對照)的腦組織中之磷酸化STAT1(pSTAT1)之染色。**圖1B**展示圖示pSTAT1染色之形態之放大影像，該形態表明pSTAT1聚積於細胞核內。參見矩形框內之染色。

**【0018】 圖2A-2E**係展示STAT1基因缺陷減弱腦中之類澱粉- $\beta$ 沈積的影像及圖。**圖2A**展示小鼠AD模型(APP/PS1小鼠)及具有STAT1缺陷之AD小鼠(APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>)中的類澱粉- $\beta$  ( $A\beta$ )之染色之影像。分別由3月齡之APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠獲得腦切片。影像展示全腦切片以及在更高放大率下海馬區域中的 $A\beta$ 之染色。**圖2B**展示描繪分別由3月齡之APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠獲得之5個連續切片中的 $A\beta$ 斑數之圖。**圖2C**展示描繪分別由3月齡之APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠獲得之5個連續切片中的 $A\beta$ 斑面積之圖。**圖2D**展示描繪分別由3月齡之野生型、APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠獲得之腦組織的TBS萃取物中之 $A\beta$ 42之Elisa量測的圖。**圖2E**展示描繪分別由3月齡之野生型、APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠獲得之腦組織的甲酸萃取物中之 $A\beta$ 42之Elisa量測的圖。\*意謂小於0.05之P值。

**【0019】 圖3A及圖3B**展示描繪CH25H鑑別為STAT1下游標靶之圖。特定言之，**圖3A**展示描繪差異表現之基因之基因本體分析的熱圖，倍數變化 $>1.5$ ， $p$ 值 $<0.05$ ，兩個生物重複用於各基因型。**圖3B**展示描繪藉由David功能註解簇聚對差異表現之基因之路徑分析的餅圖。

【0020】圖4A及4B展示分別描繪CH25H在STAT1缺陷小鼠中減少之圖及影像。特定言之，圖4A展示描繪APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之腦中之CH25H mRNA水準的即時PCR定量之結果之圖。資料代表3個獨立實驗。圖4B展示描繪3對APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之腦組織勻漿中之CH25H、STAT1及 $\alpha$ -微管蛋白的西方墨點(Western blot)之結果之影像。

【0021】圖5A及5B展示描繪STAT1物理地結合至CH25H啟動子之圖。特定言之，圖5A展示CH25H基因及其啟動子之示意圖。圖5B展示描繪染色質組蛋白免疫沈澱(ChIP)實驗之結果之圖，其中含有CH25H啟動子之DNA片段藉由STAT1抗體下拉法富集，且此富集在來自STAT1 KO (STAT1<sup>-/-</sup>)小鼠之樣品中與野生型(WT)小鼠中之富集相比減弱。

【0022】圖6A及6B展示描繪STAT1缺陷導致腦中25-OHC減少之圖。特定言之，圖6A展示描繪APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠中之全腦膽固醇水準之量測的結果之圖。各組之n=3。圖6B展示描繪用於圖6A中之膽固醇量測的相同小鼠中之25-OHC水準之量測的結果之圖。

【0023】圖7展示描繪全長APP蛋白質在STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之胞外體部分中減少之影像。將來自APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之腦組織均質化，且使核後部分經歷5%-45%蔗糖梯度離心。收集十個部分且用Triton-100溶解。將各部分用於西方墨點且針對APP及胞外體標記Flotillin1漬墨。

【0024】圖8A-8C展示描繪用25-OHC處理減少胞外體APP但增加細胞內APP之圖及影像。將具有APP過度表現之SH-SY5Y細胞用不同劑量之25-OHC處理。圖8A展示描繪來自藉由收集培養基用於胞外體純化且

溶解經純化的胞外體而製得之樣品之APP的西方墨點之結果之影像。圖8B展示描繪來自藉由收集細胞溶解物以評估細胞內APP水準而製得之樣品之APP的西方墨點之結果之影像。圖8C展示描繪對照及經25-OHC處理之細胞中之表面APP的FACS分析之結果之圖。

【0025】圖9展示描繪在用25-OHC處理之後胞外體中的A $\beta$ 42增加之圖。胞外體中之A $\beta$ 42之ELISA量測由經不同濃度25-OHC處理之細胞培養基收集。資料代表三個獨立實驗。\*p<0.05。

【0026】圖10A-10C展示描繪細胞內部之APP在用25-OHC處理之後滯留時間增加的影像。圖10A展示描繪由經FITC共軛抗體標記之表面APP示蹤的APP分子運輸之影像。在不同時間點固定細胞以檢查APP在特定時間之分佈。圖10B展示示出對照細胞中之隨時間之APP易位的延時視訊之快照之影像。圖10C展示示出經25-OHC處理之細胞中之APP易位的延時視訊之快照之影像。

【0027】圖11A、11B及11C展示描繪在APP/PS1小鼠中注射25-OHC促進A $\beta$ 沈積之影像及圖。圖11A展示針對類澱粉- $\beta$ 陳述的腦組織切片之影像。持續1個月每隔一天向2月齡之小鼠注射25-OHC或生理食鹽水作為對照。將來自此等小鼠之腦切片且針對類澱粉- $\beta$ 染色。資料代表3對注射生理食鹽水或25-OHC之小鼠。圖11B及11C展示分別描繪由鹽水對照及25-OHC小鼠獲得之5個連續全腦(圖11B)及海馬(圖11C)切片中的A $\beta$ 斑數之圖。

【0028】圖12A-12E展示描繪生成CH25H KO小鼠之圖及影像。圖12A係CH25H基因及兩種靶向sgRNA之示意圖。圖12B展示兩種靶向sgRNA之DNA序列。圖12C描繪展示CH25H基因剔除小鼠中之CH25H基

因缺失之測序結果。**圖12D**展示描繪分別WT (534 bp)及KO (488bp)條帶之基因分型結果之影像。**圖12E**展示描繪分別WT及CH25H KO小鼠中之CH25H RNA水準之即時PCR結果的圖。

**【0029】** **圖13A-13C**展示描繪在CH25H KO小鼠中A $\beta$ 斑沈積減少之影像及圖。**圖13A**係展示小鼠AD模型(APP/PS1小鼠)及具有CH25H缺陷之AD小鼠(APP/PS1/CH25H<sup>-/-</sup>)中的類澱粉- $\beta$ 之染色之影像。分別由3月齡之APP/PS1及APP/PS1/CH25H<sup>-/-</sup>小鼠獲得腦切片。影像展示全腦切片以及在更高放大率下海馬區域中的類澱粉- $\beta$ 之染色。**圖13B**及**13C**展示分別描繪由3月齡之APP/PS1及APP/PS1/CH25H<sup>-/-</sup>小鼠獲得之5個連續全腦(**圖13B**)及海馬(**圖13C**)切片中的A $\beta$ 斑數之圖。

**【0030】** **圖14**展示描繪CH25H基因缺陷改良APP/PS1小鼠中之學習及記憶之圖。對APP/PS1 (n=11)及APP/PS1/CH25H<sup>-/-</sup> (n=8)小鼠進行水迷宮訓練。在5天訓練期間記錄定位隱藏的平台所耗費之平均時間。x軸係天數且y軸係小鼠找到水迷宮中的平台所耗費之時間。

**【0031】** **圖15**展示用25-OHC以及不同劑量之三甲基乙酸潑尼龍(Prednisolone trimethylacetate)或辛伐他汀處理之細胞中的APP之西方墨點結果之影像。辛伐他汀充當強效25-OHC抑制劑。將SH-SY5Y細胞用25-OHC以及不同劑量之三甲基乙酸潑尼龍或辛伐他汀處理。24小時後溶解細胞且針對APP漬墨。

**【0032】** **圖16A、16B、16C及16D**展示描繪A $\beta$ 沈積差異並非由於APP表現量的差異或裂解APP之分泌酶之圖。**圖16A**展示描繪APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之腦中之APP mRNA水準的即時PCR定量之結果之圖。**圖16B、16C及16D**展示分別描繪Adam10 (**圖16B**)、BACE1 (**圖**

16C)及Nicastrin (圖16D)(亦即APP之 $\alpha$ 、 $\beta$ 及 $\gamma$ 分泌酶)的即時PCR定量之結果之三個圖。資料代表3個獨立實驗。

【0033】圖17A及17B展示描繪微神經膠質細胞之吞噬能力在WT與STAT1缺陷小鼠之間類似的影像及圖。圖17A展示來自與螢光珠粒一起培育之WT或STAT1缺陷小鼠的微神經膠質細胞之影像。在培育之後5分鐘固定細胞且針對內化珠粒成像。WT及KO培養基分別係來自WT或KO微神經膠質細胞之培養基。圖17B展示描繪內化之珠粒之定量結果的圖。圖17C係描繪WT及STAT1缺陷小鼠中之SV2A之即時PCR量測的圖。圖17D係描繪WT及STAT1缺陷小鼠中之CCR2之即時PCR量測的圖。

【0034】圖18A、18B、18C及18D展示分別描繪APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之腦組織中之CH25H (圖18A)及其他已知膽固醇羥化酶Cyp46a1 (圖18B)、Cyp7b1 (圖18C)及Cyp7a1 (圖18D)的即時PCR定量之結果之四個圖。結果顯示，其他膽固醇羥化酶Cyp46a1、Cyp7b1及Cyp7a1不受STAT1缺陷影響。

【0035】圖19A-19F展示描繪STAT1缺陷不影響一般脂質代謝之圖及影像。圖19A展示描繪分別3月齡之APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之體重的圖，各組之n=5。圖19B展示分別APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之肝切片之油紅O染色的影像。影像代表3對小鼠。圖19C、19D、19E及19F展示分別描繪APP/PS1及APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠中之LPL、ABCA1、APOE、HMGCR之即時PCR定量的結果之四個圖。

【0036】圖20A、20B、20C、20D、20E、20F及20G展示描繪在用50 mM KCl處理30分鐘以量測KCl處理後的即刻早期基因之誘導之後由WT或STAT1 KO小鼠獲得的初級神經元培養物中之c-fos (圖20A)、

zif268 (圖20B)、BDNF-IV (圖20C)、BDNF-IX (圖20D)、Gadd45b (圖20E)、Npas4 (圖20F)及CH25H (圖20G)之即時PCR定量的結果之圖。結果顯示，STAT1缺陷不改變基底神經活性。

#### 【實施方式】

【0037】 本發明部分基於如下新穎且驚人的發現，STAT1調節之CH25H表現影響阿茲海默症(AD)之發病機制。本發明人發現，CH25H係STAT1之下游標靶，且STAT1及其標靶CH25H促進罹患AD期間的A $\beta$ 沈積。AD患者中偵測到的較大量之磷酸化STAT1 (pSTAT1)係罹患AD之成因事件，因為遺傳耗盡STAT1延緩腦中之A $\beta$ 沈積。CH25H係將膽固醇轉化為25-OHC之酶。25-OHC之獨特特徵之一在於，其可跨越血腦屏障(BBB)，此可有益於藥物開發，因為當前處於臨床試驗下之多種藥物具有BBB穿透之問題。本發明人證實CH25H或25-OHC對AD發病機制之作用。CH25H基因剔除小鼠之A $\beta$ 沈積減少，其與STAT1基因剔除相當。相比之下，投與25-OHC增強腦中之A $\beta$ 沈積。

【0038】 本文描述治療或預防至少部分與STAT1-CH25H軸相關的疾病或醫學病狀之方法及手段，該軸產生25-OHC作為效應子以調節A $\beta$ 沈積。在該等疾病或醫學病狀中，STAT1-CH25H之活性增強進而導致A $\beta$ 沈積增加。STAT1-CH25H活性之增強可歸因於(但不限於)：1)增加之STAT1磷酸化；2)增加之STAT1或CH25H表現；3)增加之作為CH25H的受質之膽固醇。本文用於治療及預防之拮抗劑可為化學品、小分子、藥劑、非編碼RNA、反義核苷酸、肽、蛋白質或抗體或其部分。在一特定實施例中，拮抗劑係以治療有效量投與。

【0039】 本文中本發明提供用於治療與個體腦細胞中之A $\beta$ 沈積相關

的疾病或醫學病狀之方法。在一個實施例中，該等疾病或醫學病狀係由於A $\beta$ 之異常產生、轉運或清除。在另一實施例中，該等疾病或醫學病狀係由於STAT1-CH25H路徑之活性由諸如(但不限於) IFN $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6家族細胞介素之因子或急性或慢性發炎病狀所導致的增加。在另一實施例中，該等疾病或醫學病狀係由於25-OHC之量由個體中之高膽固醇量所導致的增加。

**【0040】** 本發明人發現，阻斷STAT1信號傳導、消除STAT1表現或耗盡CH25H減弱AD之發病機制，減少A $\beta$ 斑。25-OHC之化學類似物亦減少經培養細胞中之APP。本文之治療方法包括投與調節STAT1或CH25H信號傳導、表現或活性之藥劑，例如阻斷25-OHC活性或促進25-OHC降解之藥劑。詳言之，本發明提供治療阿茲海默症之方法及手段。

**【0041】** 因此，在一個態樣中，本發明係關於用於治療個體腦中的如AD之疾病之方法，其藉由抑制STAT1、其下游標靶CH25H或25-羥化膽固醇(25-OHC)來進行。

**【0042】** 因此，在一個態樣中，本發明係關於用於預防或延遲個體腦中的如AD之疾病發作之方法，其藉由抑制STAT1、其下游標靶CH25H或25-羥化膽固醇(25-OHC)來進行。

**【0043】** 在另一態樣中，本發明係關於用於減少個體腦中的類澱粉- $\beta$  (A $\beta$ )沈積之方法，其藉由抑制STAT1、其下游標靶CH25H或25-羥化膽固醇(25-OHC)來進行。

**【0044】** 在另一態樣中，本發明係關於用於預防或延遲個體腦中的類澱粉- $\beta$  (A $\beta$ )沈積之聚積之方法，其藉由抑制STAT1、其下游標靶CH25H或25-羥化膽固醇(25-OHC)來進行。

【0045】 在一個實施例中，以上方法中之STAT1抑制劑係藉由向個體投與醫藥學上有效量之STAT1抑制劑來進行。

【0046】 如本文所用，術語「個體」意謂動物，較佳係哺乳動物，且最佳係人類。在一些情況下，個體可根據存在或不存在某些生物標記而分組成不同次群組。在其他情況下，個體可基於某些生物標記之量低於抑或高於臨限值而分組成不同次群組。在任一情況下，針對本發明中之治療而言，可隨後包括或排除次群組。

【0047】 在一些實施例中，STAT1抑制劑係一種組合物，其包含醫藥學上有效量之活性劑，例如化合物、肽、抗體或其片段或核酸；及醫藥學上可接受之賦形劑。

【0048】 「賦形劑」、「載劑」、「醫藥學上可接受之賦形劑」、「醫藥學上可接受之載劑」或類似術語意指一或多種可接受的組分或成分，在意義上是與本發明組合物或調配物之其他成分相容且不會對待投與STAT1抑制劑組合物或調配物之患者、動物、組織或細胞過度有害。

【0049】 關於STAT1抑制劑之術語「醫藥學上有效量」、「有效劑量」或其類似術語意謂STAT1抑制劑的足以引發所要反應，例如減少待投與其之個體(例如，人類)之A $\beta$ 沈積或可偵測地調節分子或細胞參數或減輕AD之臨床病狀或症狀的量。例如用於人類醫療用途之有效量可為在一天投與的單一劑量或兩個或多於兩個子劑量之STAT1抑制劑；或其可經一段時間，例如經1、2、3、4或約7天至約1年以多劑量形式投與。

【0050】 治療有效量之判定完全在熟習此項技術者之能力範圍內，根據本文中所提供之詳細揭示內容來判定。舉例而言，治療有效量或劑量最初可由活體外及細胞培養物分析估計。舉另一實例而言，有效劑量可以

動物模型調配成實現所要濃度或滴度。該資訊可用以更準確地判定適用於人類之劑量。

**【0051】** 本文所描述之活性成分之毒性可在活體外、細胞培養物或實驗動物中藉由標準醫藥程序測定。由此等活體外及細胞培養物分析及動物研究獲得之資料可用於調配適用於人類之劑量範圍。劑量可視所用劑型及所用投藥途徑而變化。確切配方、投藥途徑及劑量可由個別醫師考慮患者病狀而選擇。

**【0052】** 劑量之量及時間間隔可根據活性成分之足以誘導或抑制生物效應之血液水準(最小有效濃度，MEC)獨立地調整。MEC將就各製劑而不同但可由活體外資料估計。達成MEC所需之劑量將視個別特徵及投藥途徑而定。偵測分析可用以測定血漿濃度。視待治療之病狀的嚴重程度及反應而定，給藥可為單次或複數次投藥，療程持續數天至數週或直至實現治癒或達成疾病狀態減弱為止。待投與之組合物之量當然將視例如所治療之個體、病痛之嚴重程度、投藥方式及處方醫師之判斷而定。

**【0053】** 舉例而言，在一些實施例中，STAT1抑制劑之醫藥學上有效量在人類中可低至每天約0.02 mg/kg至每天約0.03 mg/kg，且高至每天約2 mg/kg至每天約3 mg/kg。在再一些實施例中，隨著A $\beta$ 沈積變得更嚴重，有效量可高於每天3 mg/kg。在其他實施例中，有效量在STAT1抑制劑用於治療時可高於在STAT1抑制劑用於預防或延遲A $\beta$ 沈積發作時。

**【0054】** 在一些實施例中，劑量及投藥時程亦可視待治療之人類個體之性別而定。在一些情況下，與男性患者相比，一些女性患者可更易於STAT1治療，且因此劑量可更小且投藥時程可更不頻繁。在其他情況下，與男性患者相比，一些女性患者可對STAT1治療更敏感，且因此劑量可更

小且投藥時程可更不頻繁。

【0055】 在一些實施例中，投藥較佳可遠在A $\beta$ 沈積可偵測之前較早開始。在其他實施例中，投藥可在A $\beta$ 沈積偵測到之後但在AD之任何臨床症狀可見之前開始。在再其他實施例中，投藥可在AD之臨床症狀可見之後開始。在一些情況下，投藥可用於單一劑量。在其他情況下，投藥可用於多劑量，例如2、3、4、5或6個劑量。投藥可持續醫學醫生認為必需之多次。

【0056】 在其他實施例中，投藥時程及劑量可相關。舉一個實例而言，當第一投藥之間的時間段在AD之臨床症狀可見之前較早開始時，各投藥之劑量可小於第一劑量在AD之臨床症狀可見之後投與時的劑量。舉另一實例而言，當投藥頻繁(例如，每12小時一次)時，各投藥之劑量可小於在投與更不頻繁(例如，每24小時一次)時之劑量。

【0057】 在於本文所揭示之治療方法或其他方法中使用STAT1抑制劑之情形下，術語諸如「使用」、「治療(treat/treatment)」、「解決」或其類似術語意謂，STAT1抑制劑係向個體投與、遞送至個體之組織或在活體內或活體外與組織、細胞或無細胞系統接觸，例如如本文或本文所引用之參考文獻所描述。典型地，該使用或治療導致例如(1)可偵測改良或減輕所治療之病狀或症狀；(2)可偵測調節相關生物分子、治療性細胞群體或病理性細胞群體之活性、水準或數目；(3)減緩病狀之進程或延遲其發作，或降低病狀之症狀之嚴重程度；或(4)如本文所描述之另一可偵測反應。任何此類減輕可為短暫的，例如持續至少數(例如，約1至24)小時或天，例如約1、2、3、4、5、6或7天；或減輕可為長期的，例如持續約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、24、

26、28、35、42、49、56至約60天或更久；或減輕可為永久的。治療可減緩疾病或症狀之進程或其可降低其嚴重程度，例如，與不用足量STAT1抑制劑治療之個體相比，在至少一些個體中可延緩疾病或症狀發作約1-24小時、約2-10天、約2-30天或約1-5年。因此，使用STAT1抑制劑或用其治療典型地導致與適合對照(例如，未經治療)相比，可偵測調節相關免疫參數，諸如調節標靶效應子或抑制因子細胞群體、介白素、細胞介素、趨化激素、免疫球蛋白之水準、活性或相對量。STAT1抑制劑治療亦可引起調節相關轉錄因子、酶、細胞生物活性之水準或活性，或疾病之病因因子之水準或活性。用STAT1抑制劑治療可用以延遲或預防疾病、症狀或併發症發作，或減輕或減緩預先存在之疾病、病狀、症狀或併發症之進程，或促進消除疾病、病狀、症狀或併發症，例如，AD中之A $\beta$ 沈積。

**【0058】** 「減輕(ameliorate/amelioration)」、「改良」或其類似術語意謂與一個體或至少少數個體中出現之改良相一致的可偵測改良或可偵測變化，例如，在至少約2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、100%中或大致在此等值中之任兩者之間的範圍內。與不經STAT1抑制劑治療之個體相比的該改良或變化可在經治療之個體中觀測到，其中未經治療之個體患有或易於罹患相同或類似疾病、病狀、症狀或其類似物。疾病、病狀、症狀或分析參數之減輕可如下主觀或客觀地判定：例如藉由個體自評估、藉由臨床醫師之評估或藉由進行適當分析或量測，包括例如生活品質評估、疾病或病狀之進程之減緩、疾病或病狀之嚴重程度之降低或適用於生物分子、細胞之水準或活性之分析或藉由偵測個體內之細胞遷移。減輕可為短暫的、長期的或永久的；或其可在STAT1抑制劑向個體投與或用於

本文或所引用參考文獻所描述之分析或其他方法期間或之後的相關時間，例如在投與或使用STAT1抑制劑之約1小時至個體已接受STAT1抑制劑之後約3、6、9個月或更久內變化。

**【0059】** 「調節」例如症狀、分子之水準或生物活性、細胞反應、細胞活性或其類似物意謂，細胞、水準或活性或其類似物可偵測地增加或減少。與不經STAT1抑制劑治療之個體相比的該增加或減少可在經治療之個體中觀測到，其中未經治療之個體患有或易於罹患相同或類似疾病、病狀、症狀或其類似物。該等增加或減少可為至少約2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、100%、150%、200%、250%、300%、400%、500%、1000%或更大或大致在大致此等值中之任兩者之間的任何範圍內。調節可如下主觀或客觀地判定：例如藉由個體自評估、藉由臨床醫師之評估或藉由進行適當分析或量測，包括例如生活品質評估或適用於分子、細胞之水準或活性之分析或個體內之細胞遷移。調節可為短暫的、長期的或永久的；或其可在STAT1抑制劑向個體投與或用於本文或所引用參考文獻所描述之分析或其他方法期間或之後的相關時間，例如在投與或使用STAT1抑制劑之約1小時至個體已接受STAT1抑制劑之後約3、6、9個月或更久內變化。

**【0060】** 在本發明中之各個位置，例如在任何所揭示實施例中或申請專利範圍中，提及「包含」一或多種規定組分、要素或步驟之化合物、組合物、調配物或方法。本發明實施例亦具體包括本身為彼等規定組分、要素或步驟或由彼等規定組分、要素或步驟組成或基本上由彼等規定組分、要素或步驟組成之彼等化合物、組合物、調配物或方法。術語「包

含」、「由……組成」及「基本上由……組成」具有其在美國專利法下通常可接受的含義。舉例而言，「包含」一組分或步驟之所揭示組合物或方法係開放的且其包括彼等組合物或方法加另外的組分或步驟或與彼等組合物或方法加另外的組分或步驟字義相符。類似地，「由」一組分或步驟「組成」之所揭示組合物或方法係封閉的且其不包括具有可觀量之另外的組分或另外的步驟之彼等組合物或方法或與具有可觀量之另外的組分或另外的步驟之彼等組合物或方法字義不符。

**【0061】** 在一些情況下，STAT1抑制劑可為針對干擾素之抗體，因為干擾素為STAT1活化所需且抑制干擾素將防止或減少STAT1活化。干擾素抗體之一實例係芳妥珠單抗(Fontolizumab)(計劃商標名HuZAF)，一種針對干擾素- $\gamma$ 之人類化單株抗體。可製備針對干擾素之類似抗體且由熟習此項技術者針對其對干擾素之抑制效應進行篩檢，因為製備抗體及分析抗體活性之方法通常在此項技術中已知。

**【0062】** 在一些情況下，STAT1抑制劑可為針對干擾素受體之抗體，因為干擾素受體為STAT1活化所需且抑制干擾素受體將防止或減少STAT1活化。干擾素受體抗體之一實例係阿尼富路單抗(Anifrolumab)，一種靶向I型干擾素(IFN)受體1之人類單株抗體。可製備針對干擾素受體之類似抗體且由熟習此項技術者針對其對干擾素受體之抑制效應進行篩檢，因為製備抗體及分析抗體活性之方法通常在此項技術中已知。

**【0063】** 在一些情況下，STAT1抑制劑可為針對IL6之抗體，因為IL6為STAT1活化所需且抑制干擾素將防止或減少STAT1活化。IL-6抗體之一實例係司妥昔單抗(Siltuximab)，一種針對IL-6之嵌合(由人類及小鼠蛋白質製成)單株抗體。可製備針對IL-6之類似抗體且由熟習此項技術者

針對其對IL-6之抑制效應進行篩檢，因為製備抗體及分析抗體活性之方法通常在此項技術中已知。

**【0064】** 在一些情況下，STAT1抑制劑可為針對IL-6受體(IL-6R)之抗體，因為IL-6受體為STAT1活化所需且抑制IL-6受體將防止或減少STAT1活化。IL-6受體抗體之一實例係托珠單抗(Tocilizumab)，一種針對介白素-6受體之人類化單株抗體。可製備針對IL-6R之類似抗體且由熟習此項技術者針對其對IL-6R之抑制效應進行篩檢，因為製備抗體及分析抗體活性之方法通常在此項技術中已知。

**【0065】** 在再其他情況下，STAT1抑制劑可為抑制JAK1或JAK3之藥劑，因為JAK1及JAK3為活化STAT信號傳導之熟知上游激酶。抑制JAK1及JAK3之藥劑可為小分子，例如非戈替尼(Filgotinib)用作JAK1抑制劑、托法替尼(Tofacitinib)用作JAK3抑制劑。

**【0066】** 在再其他情況下，STAT1抑制劑可為減少STAT1磷酸化之藥劑。該等減少STAT1磷酸化之藥劑可為據報導可抑制STAT磷酸化之FLLL32。

**【0067】** 在再其他情況下，STAT1抑制劑可為阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。該等阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑可為麻疹病毒(Measles virus)蛋白P及V。

**【0068】** 在再其他情況下，該STAT1抑制劑係針對STAT1之RNAi藥劑。該RNAi藥劑可為靶向STAT1之任何SiRNA，例如來自ThermoFisher Scientific之產品105153。其他靶向STAT1之siRNA藥劑可由熟習此項技術者製備，因為製備針對特異標靶的siRNA之方法通常在此項技術中已知。

【0069】 在再其他情況下，作為用於治療AD、預防或延遲AD發作之方法，基因組編輯工具可用以刪除神經細胞中之整個STAT1基因、該STAT1基因之磷酸化位點、該STAT1基因之啟動子區域或該STAT1基因之SH2結構域。基因組編輯工具可為任何基因組編輯工具，只要其可用以靶向STAT1基因之特異性區域且可遞送至所關注之細胞即可。該基因組編輯工具之一個實例係如Ran, F.等人 *In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9*, *Nature* (2015)中所描述之CRISPR-CAS9系統。該基因組編輯工具之另一實例係如Zetsche等人, *Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System*, *Cell* (2015)中所描述之CRISPR-Cpf1系統。

【0070】 在其他實施例中，以上方法中之CH25H抑制係藉由向個體投與醫藥學上有效量之CH25H抑制劑來進行。在一些實施例中，CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，因為STAT1活化CH25H且抑制STAT1導致STAT1不能活化CH25H。STAT1抑制劑可為本申請案中所揭示之任何STAT1抑制劑。

【0071】 在其他實施例中，作為用於治療AD、預防或延遲AD發作之方法，基因組編輯工具可用以刪除神經細胞中之整個CH25H基因、該CH25H基因之組胺酸簇區域或該CH25H基因之啟動子區域。基因組編輯工具可為任何基因組編輯工具，只要其可用以靶向CH25H基因之特異性區域且可遞送至所關注之細胞即可。該基因組編輯工具之一個實例係如Ran, F.等人 *In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9*, *Nature* (2015)中所描述之CRISPR-CAS9系統。該基因組編輯工具之另一實例係如Zetsche等人, *Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a*

Class 2 CRISPR-Cas System, Cell (2015)中所描述之CRISPR-Cpf1系統。

【0072】 在其他實施例中，以上方法中之25-OHC抑制係藉由向個體投與醫藥學上有效量之25-OHC抑制劑來進行。

【0073】 在一些情況下，25-OHC抑制劑可為CH25H抑制劑或STAT1抑制劑，因為CH25H及STAT1在25-OHC上游且抑制CH25H或STAT1導致CH25H不能產生25-OHC。在其他情況下，25-OHC抑制劑可為25-OHC之類似物。在再其他情況下，25-OHC抑制劑可為3-羥基-3-甲基-戊二醯基-輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑。HMG-CoA還原酶抑制劑之一個實例係辛伐他汀。

【0074】 貫穿本申請案，本發明之各種實施例可按範圍格式呈現。應理解，範圍格式之描述僅為了方便及簡潔起見且不應解釋為對本發明之範疇的不靈活限制。因此，範圍之描述應視為已具體揭示所有可能之子範圍以及該範圍內之個別數值。舉例而言，對諸如1至6之範圍之描述應視為已具體揭示諸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等子範圍以及該範圍內之個別數字，例如1、2、3、4、5及6。不管範圍之寬度如何，此均適用。

【0075】 應瞭解，為清楚起見在單獨實施例之情形下描述的本發明之某些特徵亦可以組合形式提供於單一實施例中。相反，為簡潔起見在單一實施例之情形下描述的本發明之各種特徵亦可單獨地或以任何適合子組合來提供，或提供為適合於本發明之任何其他所描述實施例。在各種實施例之情形下描述的某些特徵並不視為彼等實施例之必需特徵，除非實施例在無彼等要素之情況下不起作用。

【0076】 應理解，本發明不限於本文所述之特定方法、方案及試

劑，其可變化。本文所用之術語僅用於描述特定實施例之目的，且不意欲限制本發明之範疇。

**【0077】** 下文闡述所揭示之主題之實例。所揭示主題之其他特徵、目標及優點根據詳細說明、圖式、實例及申請專利範圍將顯而易見。實質上類似或等效於本文所描述之方法及材料的方法及材料可用於實踐或測試本發明所揭示之主題。例示性方法及材料現描述如下。

**【0078】** 實例

**【0079】** 方法

**【0080】** 小鼠

**【0081】** APP/PS1 5XFAD小鼠購自Jackson lab，且STAT1缺陷小鼠由Daved Levy提供。CH25H KO小鼠係藉由crisper/cas9方法生成。用以表現Cas9蛋白之pST1374-Cas9-N-NLS-flag-連接子質體(Addgene ID44758)在先前描述(Zhou等人, 2014)。Ch25h基因序列自UCSC基因組瀏覽器網站(<http://genome.ucsc.edu/>)下載。合成兩個sgRNA寡核苷酸且黏接至pUC57-sgRNA構築體。活體外轉錄如先前所描述進行(Zhou等人, 2014)。將Cas9 mRNA及sgRNA注射於C57BL6/J之背景中。將APP/PS1小鼠與CH25H<sup>-/-</sup>小鼠配對以生成攜有APP/PS1基因及CH25H之WT或KO對偶基因的後代。將APP/PS1小鼠與STAT1<sup>-/-</sup>小鼠配對以生成攜有APP/PS1基因及STAT1之WT或KO對偶基因的後代。所有小鼠均處於C57BL/6遺傳背景下且在無特定病原體之條件下圈養於新加坡國立大學(National University of Singapore)。所有實驗均對3-4月齡之小鼠進行且經NUS之機構動物照護與使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)批准。

**【0082】 組織溶解物製備及蔗糖梯度**

**【0083】** 將小鼠腦稱重且於9倍體積之TBS中均質化。將所得組織勻漿在4°C下在1000g下離心15分鐘。上清液視為核後部分。小心地使核後部分經歷5%-45%蔗糖梯度，且在4°C下在147,000g下離心16小時。在離心之後，自頂部至底部，1 ml視為各部分。添加Triton至各部分以達至0.1%之最終濃度以便溶解膜結合蛋白。所得樣品用於西方墨點分析。

**【0084】 胞外體製備**

**【0085】** 將過度表現人類APP之SH-SY5Y細胞於具有10% FBS之DMEM中培養。在胞外體製備之前一天，將培養基變為空白DMEM以避免血清胞外體之污染。在培養基變化之後24小時，將培養基收集且在200g下旋轉5分鐘以使浮動細胞集結下沉。將無細胞培養基進一步在4°C下在100,000g下離心1小時，且將含有胞外體之集結粒溶解於RIPA緩衝液中。

**【0086】 微陣列分析**

**【0087】** 微陣列分析使用由Molecular Genomics服務之affymetrix微陣列系統(Affymetrix)進行。資料分析用GeneSpring軟體進行。差異表現之基因在David功能註解簇聚網站(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)用作輸入，使用中等分類嚴格性之預設設定。簇聚之結果重製於餅圖中。

**【0088】 組織學分析**

**【0089】** 將組織固定於4%多聚甲醛中、脫水、滲透且石蠟包埋。將切片(5 μm)用蘇木精與伊紅(H&E)染色以評估一般形態。在免疫螢光(IF)或免疫組織化學(IHC)中，將切片復水且用針對Aβ (細胞信號傳導)之初級

抗體染色，隨後與螢光共軛二級抗體(Invitrogen)一起培育。在油紅O染色中，將肝包埋於Tissue Tek (Electron Microscopy Sciences)中且冷凍於-80°C下。切割10 μm厚之切片且用dH<sub>2</sub>O使其水合，隨後於油紅O工作溶液(含0.3%油紅O (Sigma)之60%異丙醇)中培育1小時。此後，將載片於60%異丙醇中快速洗滌三次，直至異丙醇自載片滴落明顯。隨後，將載片用H<sub>2</sub>O洗滌且用蘇木精複染。

### **【0090】 即時PCR**

**【0091】** 總RNA用Trizol試劑(Invitrogen)根據製造商之說明書自細胞提取。互補DNA (cDNA)用Superscript逆轉錄酶(Invitrogen)合成。基因表現藉由7500 即時PCR系統(Applied Biosystems)與SYBR qPCR套組(KAPA)來量測。Actib、Gapdh或Rn18S用作內部對照。引子序列在請求時可獲得。

### **【0092】 ELISA**

**【0093】** Aβ<sub>42</sub>之定量係以ELISA套組(Millipore)根據製造商之說明書進行。

### **【0094】 染色質免疫沈澱分析**

**【0095】** 將來自APP/PS1或APP/PS1/STAT1-/-小鼠之腦半球之一半於9倍體積之TBS中均質化以獲得腦組織勻漿。藉由添加最終濃度為1%之甲醛10分鐘進行交聯，隨後用甘胺酸淬滅。將組織勻漿相繼用低張緩衝液及核溶解緩衝液處理以釋放染色質。將染色質藉由音波處理加以片段化且用蛋白G珠粒預清除，且隨後在4°C下用抗STAT1抗體(Santa Cruz)或正常兔IgG (Santa Cruz)沈澱隔夜。在洗滌及溶離之後，藉由在65°C下培育8小時進行交聯逆轉。將溶離之DNA純化且如先前所描述藉由RT-PCR以對

CH25H啟動子具有特異性之引子進行分析。

### 【0096】 統計學

【0097】 統計顯著性係藉由史都登氏t檢定(Student's t test)使用GraphPad Prism 6.01判定。p值<0.05視為顯著。臨床記分之p值判定係藉由針對多重比較之單因子多範圍變異數分析(ANOVA)進行。除非另外規定，否則資料係以平均值及平均值之標準誤差呈現(平均值±SEM)。

### 【0098】 實例1 Stat1基因剔除小鼠具有減少之A $\beta$ 沈積

【0099】 吾人證實，AD病例中之STAT1表現高於年長經匹配之對照病例(圖1A及1B)。在圖1A中，對照細胞中未見磷酸化STAT1 (pSTAT1)染色。相比之下，如相同圖1A中及圖1B中的病例-1之照片之放大快照所示，三個病例中之每一者觀察到多很多的pSTAT1染色。

【0100】 為了理解STAT1路徑活化為AD發病機制之病因抑或為AD晚期之神經發炎之結果，吾人將STAT1<sup>-/-</sup>小鼠與APP/PS1小鼠雜交以生成具有STAT1<sup>-/-</sup>背景之AD小鼠。將APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠及其APP/PS1基因型之同窩對照養至3-4個月且處死用於組織學檢查A $\beta$ 沈積。吾人驚人地發現，Stat1<sup>-/-</sup>小鼠中的A $\beta$ 數以及由A $\beta$ 佔據之面積具一致性減小(圖2A及2B)。當吾人量測TBS或甲酸萃取物中之A $\beta$ 42時，觀測到類似結果(圖2C及2D)。此外，A $\beta$ 之減少並非由於APP表現量的變化或裂解APP之分泌酶(圖16A及16B)。

【0101】 實例2 Stat1-KO小鼠中之A $\beta$ 沈積減少係由於其下游標靶CH25H之減少

【0102】 吾等微陣列資料將CH25H鑑別為AD病狀中之STAT1調節基因(圖3A及3B)。此外，吾人藉由即時PCR、西方墨點及ChIP分析證實

STAT1對CH25H之調節作用(圖4A、4B、5A、5B)。如描繪即時PCR結果之圖4A中所示，CH25H mRNA表現在STAT1缺陷小鼠中顯著降低。如描繪西方墨點結果之圖4B中所示，CH25H蛋白質水準在STAT1缺陷小鼠中亦顯著降低。來自圖5A及5B中的ChIP分析之結果亦顯示，在STAT1缺陷小鼠中，較少STAT1結合至CH25H基因啟動子序列。STAT1缺陷小鼠中的25-OHC水準之降低進一步支持如下觀念，STAT1-CH25H軸控制腦25-OHC水準(圖6A-6B)。

### **【0103】 實例3 STAT1-CH25H調節之25-OHC影響胞外體中之APP分泌**

**【0104】** 將小鼠腦組織勻漿藉由蔗糖梯度分離以檢查APP蛋白質之細胞定位。簡言之，APP之分佈模式在5XFAD與5XFAD/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之間是類似的，除了最高密度之部分除外(該部分係一種包外體標記Flotillin1富集的)。STAT1<sup>-/-</sup>小鼠在此部分中具有顯著更大量之APP(圖7)。

**【0105】** 吾人使用APP過度表現SH-SY5Y細胞株進一步檢查胞外體APP中之差異是否是因為25-OHC。將細胞用不同劑量之25-OHC處理，並收集細胞溶解物及來自培養基之胞外體兩者。25-OHC在增加細胞APP同時減少胞外體APP方面展示劑量依賴性效應(圖8A及8B)。如圖8A中所示，隨著25-OHC之劑量增加，胞外體部分中所見APP更少。相比之下，隨著25-OHC之劑量增加，細胞溶解物部分中所見APP更多。

**【0106】** 表面APP之FACS分析亦展現25-OHC增加細胞表面上之APP之量(圖8C)。在25-OHC處理之後於過度表現APP之細胞之細胞表面上偵測到更多量之APP。

**【0107】** 此外，吾人發現在用25-OHC處理之後胞外體中之A $\beta$ 42增加。收集經不同濃度25-OHC處理之細胞培養基，且藉由ELISA來量測自培養基收集之胞外體中的A $\beta$ 42。如圖9中所示，在來自用增加之25-OHC濃度處理的細胞之培養基中偵測到增加之A $\beta$ 42。資料代表三個獨立實驗。

#### **【0108】 實例4 25-OHC增加細胞中APP之滯留時間**

**【0109】** 多種機制可有助於在25-OHC處理之後增加細胞APP。然而，吾等小鼠資料表明，APP之合成及降解均正常：APP之表現類似，且用於APP裂解之酶亦相當(圖16A及16B)。如圖16A中所示，APP之表現量無關於STAT1缺陷而類似。如圖16B中所示，Adam10、BACE1及Nicastrin (亦即分別為APP之 $\alpha$ 、 $\beta$ 及 $\gamma$ 分泌酶)之表現量亦無關於STAT1缺陷而類似。

**【0110】** 吾人繼續檢查APP蛋白質之運輸。藉由抗體標記表面APP，且將細胞安置回培育箱且在不同時間點固定用於染色。在未經處理之細胞中，APP快速達至細胞中之特定區室，且在6小時內，信號消失，而在經25-OHC處理之細胞中，APP之運輸更慢(圖10A)。延時電影明顯展示，在未經處理之細胞中，APP簇聚至特定區室，而在經25-OHC處理之細胞中，APP在檢查時間內仍均勻地分佈(圖10B)。

#### **【0111】 實例5 CH25H KO再利用STAT1 KO之表型以延遲AD發病**

**【0112】** 吾人研究CH25H KO在AD發病機制中之作用。設計靶向CH25H之SgRNA，sgRNA1係SEQ ID NO: 1且sg RNA2係SEQ ID NO: 2。參見圖12A及12B。利用兩個sg RNA，藉由crisper/cas9方法基因剔除

CH25H基因以便46個鹼基對(bp)在CH25H基因之外顯子中缺失(參見圖12C)，產生CH25H基因剔除(KO)小鼠。

**【0113】** 在CH25H KO小鼠中，偵測到CH25H基因之46 bp片段之缺失，488 bp條帶係缺失之CH25H基因且534 bp係野生型基因。CH25H mRNA於CH25H KO小鼠中之表現顯著降低(圖12E)。

**【0114】** 在與5XFAD小鼠雜交後，CH25H KO展示類似於STAT1 KO之表型。A $\beta$ 在免疫染色及Elisa定量中均極大地減少(分別見圖13A、13B及13C)。相反，注射25-OHC之小鼠具有顯著大量之A $\beta$  (圖11A、11B及11C)。

**【0115】** 為了測試減少之A $\beta$ 對認識能力之作用，藉由水迷宮檢查小鼠。5XFAD小鼠逐漸學會定位水下面之平台，而CH25H KO小鼠找到平台所耗時顯著( $p < 0.05$ )更少，表明其在學習及記憶任務方面表現得更好(圖14)。

#### **【0116】 實例6 辛伐他汀抑制25-OHC誘導之APP聚積**

**【0117】** 吾人為獲得潛在25-OHC抑制劑篩檢多種小分子且發現辛伐他汀阻斷25-OHC誘導之細胞APP增加。該效應在低至10 nM辛伐他汀下可見，其遠低於可能會造成細胞毒性作用之劑量。

**【0118】** 如圖15中所示，25-OHC處理導致APP水準增加。然而，辛伐他汀處理可減少由25-OHC處理所誘導之APP水準增加。相比之下，三甲基乙酸潑尼龍處理對由25-OHC所誘導之APP水準增加無效果。因此，辛伐他汀係25-OHC之強效抑制劑。

**【0119】 實例7 WT與STAT1缺陷微神經膠質細胞之間的吞噬作用類似**

**【0120】** 將WT或STAT1<sup>-/-</sup>微神經膠質細胞與螢光珠粒一起培育以測試其吞噬能力。為了檢查培養基中分泌之因子的效應，將兩種細胞保持於來自WT細胞之培養基或來自STAT1<sup>-/-</sup>細胞之培養基中。成像及定量顯示，吞噬作用在所有測試條件下均類似(圖17A及17B)。吾人亦量測SV2a及CCR2 (參與吞噬過程之關鍵基因)之mRNA。其表現量在APP/PS1與APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>之間類似(圖17C及圖17D)。

**【0121】 實例8 CH25H係STAT1依賴性膽固醇羥化酶**

**【0122】** 吾人測試將羥基在不同位置添加至膽固醇之數種已知膽固醇羥化酶，包括CH25H、Cyp46a1、Cyp7b1及Cyp7a1。在吾人測試的酶之中，僅CH25H展示STAT1依賴性表現模式，因為僅CH25H之表現顯著降低(圖18A、18B、18C及18D)。

**【0123】 實例9 STAT1缺陷並不導致一般代謝缺陷**

**【0124】** CH25H最初已知可調節膽固醇代謝。然而，當吾人比較體重、肝中之脂質沈積及參與脂質代謝之關鍵酶時，WT與STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之間無顯著變化(圖19A-19F)。如圖19A中所示，在APP/PS1與APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之間，體重無顯著差異。如圖19B中所示，在APP/PS1與APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之間，肝細胞中之脂質沈積無顯著差異。此外，如圖19C-19F中所示，在APP/PS1與APP/PS1/STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之間，包括LPL、ABCA1、APOE、HMGCR的關鍵酶之表現無顯著差異。

**【0125】 實例10 STAT1缺陷並不改變藉由即刻早期基因之誘導量測的神經元活性**

**【0126】** 將來自WT或STAT1<sup>-/-</sup>小鼠之初級海馬神經元培養，且隨後用50 mM KCl處理。藉由RT-PCR來量測包括cfos、Zif268、BDNF-

IV、BDNF-IX、Gadd45b、Npas4及Ch25h的一些即刻早期基因之誘導，作為神經元活性之標記。如圖20A-20G中所示，WT及STAT1<sup>-/-</sup>神經元均能夠誘導此等基因，程度類似。

**參考文獻：**

Bonni, A., Y. Sun, M. Nadal-Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D.

Yancopoulos and M. E. Greenberg (1997). "Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway." **Science** 278(5337): 477-483.

Chen, Y. C., W. L. Hsu, Y. L. Ma, D. J. Tai and E. H. Lee (2014). "CREB SUMOylation by the E3 ligase PIAS1 enhances spatial memory." **J Neurosci** 34(29): 9574-9589.

Citron, M. (2010). "Alzheimer's disease: strategies for disease modification." **Nat Rev Drug Discov** 9(5): 387-398.

De Strooper, B., R. Vassar and T. Golde (2010). "The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease." **Nat Rev Neurol** 6(2): 99-107.

Delrieu, J., P. J. Ousset, T. Yoisin and B. Vellas (2014). "Amyloid beta peptide immunotherapy in Alzheimer disease." **Rev Neurol (Paris)** 170(12): 739-748.

Do, D. V., J. Ueda, D. M. Messerschmidt, C. Lorthongpanich, Y. Zhou, B. Feng, G. Guo, P. J. Lin, M. Z. Hossain, W. Zhang, A. Moh, Q. Wu, P. Robson, H. H. Ng, L. Poellinger, B. B. Knowles, D. Solter and X.

Y. Fu (2013). "A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo." **Genes Dev** 27(12): 1378-1390.

Doody, R. S., R. G. Thomas, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, R. Raman, X. Sun, P. S. Aisen, E. Siemers, H. Liu-Seifert, R. Mohs, C. Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering and G. Solanezumab Study (2014). "Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease." **N Engl J Med** 370(4): 311-321.

Engelhart, M. J., M. I. Geerlings, J. Meijer, A. Kiliaan, A. Ruitenberg, J. C. van Swieten, T. Stijnen, A. Hoffnan, J. C. Witteman and M. M. Breteler (2004). "Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study." **Arch Neurol** 61(5): 668-672.

Etminan, M., S. Gill and A. Samii (2003). "Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies." **BMJ** 327(7407): 128.

Gao, Q., M. J. Wolfgang, S. Neschen, K. Morino, T. L. Horvath, G. I. Shulman and X. Y. Fu (2004). "Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation." **Proc Natl Acad Sci USA** 101(13): 4661-4666.

Green, R. C., L. S. Schneider, D. A. Amato, A. P. Beelen, G. Wilcock, E. A. Swabb, K. H. Zavitz and G. Tarenflur bil Phase 3 Study

(2009). "Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial." **JAMA** 302(23): 2557-2564.

Heneka, M. T., M. P. Kummer, A. Stutz, A. Delekate, S. Schwartz, A. Vieira-Saecker, A. Griep, D. Axt, A. Remus, T. C. Tzeng, E. Gelpi, A. Halle, M. Korte, E. Latz and D. T. Golenbock (2013). "NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice." **Nature** 493(7434): 674-678.

Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova and J. A. Nicoll (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." **Lancet** 372(9634): 216-223.

Huang, Y. and L. Mucke (2012). "Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies." **Cell** 148(6): 1204-1222.

Ikeda, S., C. W. Wong, D. Allsop, M. Landon, M. Kidd and G. G. Glenner (1987). "Immunogold labeling of cerebrovascular and neuritic plaque amyloid fibrils in Alzheimer's disease with an antibeta protein monoclonal antibody." **Lab Invest** 57(4): 446-449.

Jiang, W., Y. Zhang, F. Meng, B. Lian, X. Chen, X. Yu, E. Dai, S. Wang, X. Liu, X. Li, L. Wang and X. Li (2013). "Identification of active transcription factor and miRNA regulatory pathways in Alzheimer's

disease." **Bioinformatics** 29(20): 2596-2602.

Kitamura, Y., S. Shimohama, T. Ota, Y. Matsuoka, Y. Nomura and T. Taniguchi (1997). "Alteration of transcription factors NF-kappaB and STAT1 in Alzheimer's disease brains." **Neurosci Lett** 237(1): 17-20.

Morelli, L., M. I. Prat and E. M. Castano (1999). "Differential accumulation of soluble amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 in human monocytic and neuroblastoma cell lines. Implications for cerebral amyloidogenesis." **Cell Tissue Res** 298(2): 225-232.

Ozudogru, S. N. and C. F. Lippa (2012). "Disease modifying drugs targeting beta-amyloid." **Am J Alzheimers Pis Other Demen** 27(51): 296-300.

Palop, J. J. and L. Mucke (2009). "Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease." **Arch Neurol** 66(4): 435-440.

Roher, A. E., M. O. Chaney, Y. M. Kuo, S. D. Webster, W. B. Stine, L. J. Haverkamp, A. S. Woods, R. J. Cotter, J. M. Tuohy, G. A. Krafft, B. S. Bonnell and M. R. Emmerling (1996). "Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease." **J Biol Chem** 271(34): 20631-20635.

Salloway, S., R. Sperling, N. C. Fox, K. Blennow, W. Klunk, M. Raskind, M. Sabbagh, L. S. Honig, A. P. Porsteinsson, S. Ferris, M. Reichert, N. Ketter, B. Nejadnik, V. Guenzler, M. Miloslavsky, D. Wang, Y. Lu, J. Lull, I. C. Tudor, E. Liu, M. Grundman, E. Yuen, R. Black, H. R. Brashear, Bapineuzumab and I. Clinical Trial (2014). "Two phase 3

trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease." **N Engl J Med** 370(4): 322-333.

Schmidt, R., H. Schmidt, J. D. Curb, K. Masaki, L. R. White and L. J. Launer (2002). "Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study." **Ann Neurol** 52(2): 168-174.

Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." **Physiol Rev** 81: 741-766.

Tabira, T. (2011). "[Immunotherapy targeting on Abeta for Alzheimer disease]." **Nihon Rinsho** 69 Suppl 10(Pt 2): 77-82.

Tai, D. J., W. L. Hsu, Y. C. Liu, Y. L. Ma and E. H. Lee (2011). "Novel role and mechanism of protein inhibitor of activated STAT1 in spatial learning." **EMBO J** 30(1): 205-220.

Tanzi, R. E. and L. Bertram (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." **Cell** 120(4): 545-555.

Weggen, S., J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde and E. H. Koo (2001). "A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity." **Nature** 414(6860): 212-216.

Wisniewski, T. (2012). "Active immunotherapy for Alzheimer's disease." **Lancet Neurol** 11(7): 571- 572.

Wolfe, M. S., J. De Los Angeles, D. D. Miller, W. Xiaand D. J. Selkoe (1999). "Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease." **Biochemistry** 38(35): 11223-11230.

## 【序列表】

<110> 中國大陸商健艾仕生物醫藥有限公司  
傳新元

<120> 用於治療阿茲海默症之組合物及方法

<130> 35961-004

<140> PCT/US18/31901

<141> 2018-05-09

<150> 62/506782

<151> 2017-05-16

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 合成

<400> 1

ggcagaagct gctttacgga

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 合成

<400> 2

gctgacactc taccagcacc

20



201900216

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

用於治療阿茲海默症之組合物及方法

### 【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING  
ALZHEIMER'S DISEASE

### 【中文】

本發明揭示藉由靶向AD發病機制中之新穎路徑STAT1-CH25H來治療個體中阿茲海默症(AD)或預防或延遲其發作之方法，特定言之係藉由向該個體投與醫藥學上有效量之STAT1抑制劑、CH25H抑制劑或25-OHC抑制劑，例如3-羥基-3-甲基-戊二醯基-輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑，諸如辛伐他汀(simvastatin)。

### 【英文】

Disclosed are methods for treating or preventing or delaying outset of Alzheimer's disease (AD) in a subject by targeting the novel pathway STAT1-CH25H in AD pathogenesis, specifically by administering to the subject a pharmaceutically effective amount of a STAT1 inhibitor, a CH25H inhibitor, or a 25-OHC inhibitor, for example, a 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG- CoA) reductase inhibitor such as simvastatin.

### 【指定代表圖】

圖2B

【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，該方法包含向該個體投與醫藥學上有效量之STAT1抑制劑。

### 【第2項】

如請求項1之方法，其中該STAT1抑制劑係針對IFN或IFN受體之抗體。

### 【第3項】

如請求項1之方法，其中該STAT1抑制劑係針對IL-6或IL6受體之抗體。

### 【第4項】

如請求項1之方法，其中該STAT1抑制劑係抑制JAK1及JAK3之藥劑。

### 【第5項】

如請求項1之方法，其中該STAT1抑制劑係減少STAT1磷酸化之藥劑。

### 【第6項】

如請求項1之方法，其中該STAT1抑制劑係阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。

### 【第7項】

如請求項1之方法，其中該STAT1抑制劑係針對STAT1之RNAi藥劑。

### 【第8項】

一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，該方法包含向該個體投與醫藥學上有效量之CH25H抑制劑。

**【第9項】**

如請求項8之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑。

**【第10項】**

如請求項8之方法，其中該CH25H抑制劑係為針對IFN或IFN受體之抗體的STAT1抑制劑。

**【第11項】**

如請求項8之方法，其中該CH25H抑制劑係為針對IL-6或IL6受體之抗體的STAT1抑制劑。

**【第12項】**

如請求項8之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，其為抑制JAK1及JAK3之藥劑。

**【第13項】**

如請求項8之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，其為減少STAT1磷酸化之藥劑。

**【第14項】**

如請求項8之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，其為阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。

**【第15項】**

如請求項8之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，其為針對STAT1之RNAi藥劑。

**【第16項】**

一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，該方法包含向該個體投與醫藥學上有效量之25-OHC抑制劑。

**【第17項】**

如請求項16之方法，其中該25-OHC抑制劑係CH25H抑制劑或STAT1抑制劑。

**【第18項】**

如請求項16之方法，其中該25-OHC抑制劑係25-OHC之類似物。

**【第19項】**

如請求項16之方法，其中該25-OHC抑制劑係3-羥基-3-甲基-戊二醯基-輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑。

**【第20項】**

如請求項19之方法，其中該HMG-CoA還原酶抑制劑係辛伐他汀(simvastatin)。

**【第21項】**

一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，該方法包含向該個體投與醫藥學上有效量之STAT1抑制劑。

**【第22項】**

如請求項21之方法，其中該STAT1抑制劑係針對IFN或IFN受體之抗體。

**【第23項】**

如請求項21之方法，其中該STAT1抑制劑係針對IL-6或IL-6受體之抗體。

**【第24項】**

如請求項21之方法，其中該STAT1抑制劑係抑制JAK1及JAK3之藥劑。

**【第25項】**

如請求項21之方法，其中該STAT1抑制劑係減少STAT1磷酸化之藥劑。

**【第26項】**

如請求項21之方法，其中該STAT1抑制劑係阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。

**【第27項】**

如請求項21之方法，其中該STAT1抑制劑係針對STAT1之RNAi藥劑。

**【第28項】**

一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，該方法包含向該個體投與醫藥學上有效量之CH25H抑制劑。

**【第29項】**

如請求項28之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑。

**【第30項】**

如請求項28之方法，其中該CH25H抑制劑係為針對IFN或IFN受體之抗體的STAT1抑制劑。

**【第31項】**

如請求項28之方法，其中該CH25H抑制劑係為針對IL-6或IL-6受體之抗體的STAT1抑制劑。

**【第32項】**

如請求項28之方法，其中該CH25H抑制劑係為抑制JAK1及JAK3之藥劑的STAT1抑制劑。

**【第33項】**

如請求項28之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，其為減少STAT1磷酸化之藥劑。

**【第34項】**

如請求項28之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，其為阻止STAT1易位至細胞核中之藥劑。

**【第35項】**

如請求項28之方法，其中該CH25H抑制劑係STAT1抑制劑，其為針對STAT1之RNAi藥劑。

**【第36項】**

一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，該方法包含向該個體投與醫藥學上有效量之25-OHC抑制劑。

**【第37項】**

如請求項36之方法，其中該25-OHC抑制劑係CH25H抑制劑或STAT1抑制劑。

**【第38項】**

如請求項36之方法，其中該25-OHC抑制劑係25-OHC之類似物。

**【第39項】**

如請求項36之方法，其中該25-OHC抑制劑係3-羥基-3-甲基-戊二醯基-輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑。

**【第40項】**

如請求項39之方法，其中該HMG-CoA還原酶抑制劑係辛伐他汀。

**【第41項】**

一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 提供基因組編輯工具；
- b. 將該基因組編輯工具遞送至神經細胞；及
- c. 藉由刪除整個STAT1基因、該STAT1基因之磷酸化位點、該STAT1基因之啟動子區域或該STAT1基因之SH2結構域來編輯該STAT1基因。

**【第42項】**

如請求項41之方法，其中該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

**【第43項】**

一種治療個體中阿茲海默症(AD)之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 提供基因組編輯工具；
- b. 將該基因組編輯工具遞送至神經細胞；及
- c. 藉由刪除整個CH25H基因、該CH25H基因之組胺酸簇區域或該CH25H基因之啟動子區域來編輯該CH25H基因。

**【第44項】**

如請求項43之方法，其中該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

**【第45項】**

一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 提供基因組編輯工具；
- b. 將該基因組編輯工具遞送至神經細胞；及

c. 藉由刪除整個STAT1基因、該STAT1基因之磷酸化位點、該STAT1基因之啟動子區域或該STAT1基因之SH2結構域來編輯該STAT1基因。

**【第46項】**

如請求項45之方法，其中該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

**【第47項】**

一種預防或延遲個體中阿茲海默症(AD)發作之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 提供基因組編輯工具；
- b. 將該基因組編輯工具遞送至神經細胞；及
- c. 藉由刪除整個CH25H基因、該CH25H基因之組胺酸簇區域或該CH25H基因之啟動子區域來編輯該CH25H基因。

**【第48項】**

如請求項47之方法，其中該基因組編輯工具係CRISPR-CAS9系統。

















































































































